

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-262069

(43)Date of publication of application : 07.10.1997

---

(51)Int.Cl.

A23L 1/325

A23B 4/044

A23L 1/31

---

(21)Application number : 08-071687

(71)Applicant : YANAGIYA HONTEN:KK

(22)Date of filing : 27.03.1996

(72)Inventor : KIKUKAWA KIYOMI

KATOU TETSUHIRO

HIRAMOTO KAZUYUKI

---

(54) INHIBITION OF FORMATION OF HETEROCYCLIC AMINES AND PRODUCTION PROCESS FOR BOILED AND DRIED FISH UTILIZING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a process for inhibiting the formation of heterocyclic amines which widely distribute in heat-processed fish meat and animal meat and is regarded as to be carcinogenic and provide a production process for dried bonito by utilizing the process of inhibiting the formation of heterocyclic amines.

SOLUTION: When fish meat or animal meat is heat-treated to produce food products, a phenolic antioxidant is used. In addition, utilizing this process, bonito meat is boiled or aged in the presence of a phenolic antioxidant, green tea or an extract of green tea to produce dried bonito. The phenolic antioxidant is preferably butylated hydroxyanisole, propyl gallate, sesamol, esculetin or epigallocatechin gallate.

---

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 21.07.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 14.11.2000

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

AL5

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-262069

(43) 公開日 平成9年(1997)10月7日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	片内整理番号	F I	技術表示箇所
A 2 3 L	1/325		A 2 3 L 1/325	A
A 2 3 B	4/044		1/31	A
A 2 3 L	1/31		A 2 3 B 4/04	5 0 5 Z

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願平8-71687

(22) 出願日 平成8年(1996)3月27日

(71) 出願人 39202/988

株式会社柳屋本店

静岡県焼津市東小川2丁目1番10号

(72) 発明者 菊 川 清 見

東京都八王子市堀之内1432-1

(72) 発明者 加 藤 哲 太

東京都八王子市堀之内1432-1

(72) 発明者 平 本 一 幸

東京都八王子市堀之内1432-1

(74) 代理人 弁理士 加藤 静富 (外1名)

(54) 【発明の名称】 ヘテロサイクリックアミン類の生成抑制方法およびこれを利用する鰹節の製造方法

(57) 【要約】

【課題】 魚肉や畜肉の加熱加工食品中の発癌性を有するとされるヘテロサイクリックアミン類の生成を抑制する方法と、この方法を利用する鰹節の製造方法を提供する。

【解決手段】 魚肉または畜肉の加熱食品を調製するに際し、フェノール性抗酸化剤を使用する。フェノール性抗酸化剤、緑茶、または緑茶抽出液の存在下で、鰹肉の煮熟を行う。上記のフェノール性抗酸化剤は、butylated hydroxyanisole, propyl gallate, sesamol, esculetin, epigallocatechin gallateが好ましい。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 魚肉または畜肉の加熱食品を調製するに際し、フェノール性抗酸化剤を使用することを特徴とする魚肉または畜肉の加熱食品におけるヘテロサイクリックアミン類の生成抑制方法。

【請求項2】 フェノール性抗酸化剤が、butylated hydroxyanisole, propyl gallate, sesamol, esculetin, epigallocatechin gallateであることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】 フェノール性抗酸化剤、緑茶、または緑茶抽出液の存在下で、魚肉の煮熟を行うことを特徴とする節類の製造方法。

【請求項4】 フェノール性抗酸化剤が、butylated hydroxyanisole, propyl gallate, sesamol, esculetin, epigallocatechin gallateであることを特徴とする請求項3記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、発癌性を有するとされるヘテロサイクリックアミン類の生成を抑制する方法と、この方法を利用する節類の製造方法とに関する。

【0002】

【技術背景】魚肉（魚介類の他、タコ、イカ、その他の水産動物を含む意）や畜肉（鳥類、獣類を含む意）等を原料とする加熱食品において検出される変異原性ならびに発癌性のヘテロサイクリックアミン類は、糖、アミノ酸、クレアチニンによるMaillard様反応によって生成する、すなわち、魚肉、畜肉を調理または加工する際に生成することが知られている。

【0003】imidazoquinolineを含む約20種のヘテロサイクリックアミン類が杉浦らによって発見されて以来、imidazoquinoxaline類とimidazopyridine類が、調理・加工した畜肉、魚肉中に見出されている。

【0004】ほとんどのヘテロサイクリックアミンは、ゲッ歯類（ネズミ類）で発癌性を示すことが報告され、今日では、それらの化合物は、人でも発癌物質として作用している可能性があるとして、その生成を防ぐ多くの努力がなされている。

【0005】Weisburgerらによる初期の研究では、クロロゲン酸とBHAとEDTAが牛肉での変異原の生成を抑え、鉄イオンがこれを促進することを報告し、牛肉での変異原の生成に脂質過酸化が寄与することを示唆している。

【0006】それ以来、ほとんどの調理・加工肉における変異原性のimidazoquinoline型やimidazoquinoxaline型のヘテロサイクリックアミンは、糖、アミノ酸およびクレアチン（また

はクレアチニン）のMaillard反応により生成することが解明されている。

【0007】すなわち、初期段階では、糖とアミノ酸のMaillard反応によりdihydropyridine（またはpyridine）とアルデヒドが生成し、最終段階で、これらの化合物とクレアチニンとの縮合反応により、ヘテロサイクリックアミンが生成すると考えられている。

【0008】このMaillard型反応での変異原の生成を最小にしようとする研究が多くなされ、JonesとWeisburgerは、トリプトファン、インドール誘導体、プロリンを、モデル系や牛肉に添加すると、反応性のアルデヒドのマスキングによると推測される作用により、変異原の生成が少なくなることを報告している。

【0009】また、SkogとJagerstadは、モデル系と牛肉において、糖が過剰に存在すると、クレアチンやクレアチニンをマスキングして変異原の生成を減少することを報告している。

【0010】さらに、牛肉抽出物、魚肉およびモデル系において、含水量が高いと変異原の生成を抑えること、脂肪も変異原の生成を効果的に抑制することが、報告されている。

【0011】なお、フリーラジカルMaillard反応中間体であるpyradineやpyridineのカチオンラジカルを含むモデル系での変異原の生成機構の別の仮説も出ている。

【0012】すなわち、Weisburgerによる最近の論文において、BHAによる牛肉での変異原生成抑制は、抗酸化剤によるMaillard産物の妨害によると推測される旨が記述されている。

【0013】ただし、変異原の生成がフリーラジカルによるものであること支持する証拠はほとんどない。

【0014】

【発明の目的】本発明は、以上の報告を踏まえ、魚肉や畜肉を食材とする調理・加工食品におけるヘテロサイクリックアミン類の生成を抑制する方法を提供し、またこの方法を利用してヘテロサイクリックアミン類を含まない節類の製造方法を提供することを目的とする。

【0015】

【発明の概要】本発明者らは、上記目的を達成するために、サバ、ムロアジ、イワシ、マグロ節等の魚肉、例えば、カツオ肉と、モデル系（グルコース／グリシンの混合系およびグルコース／グリシン／クレアチニンの混合系）とを用い、次のような検討を行い、次のような知見を得た。

【0016】（1）魚肉（例えば、カツオ肉）とモデル系は、加熱すると、imidazoquinoline型とimidazoquinoxane型のヘテロサイクリックアミン類を生成するが、加熱に際しフェノール

性抗酸化剤を添加すると、これら変異原の生成を抑制するか、また変異原の生成とその抑制がラジカル機構を通じてのものを検討した。

【0017】この結果、フェノール性抗酸化剤は、上記変異原の生成を効果的に抑制すること、また該抗酸化剤は、フリーラジカルMaillard中間体を捕捉して変異原の生成を抑制すること、の知見を得た。

【0018】(2) 上記(1)のフェノール性抗酸化剤についてさらに検討を重ね、次の知見を得た。イ) モデル系のジエチレングリコール水溶液中での加熱において、imidazoquinoline型ヘテロサイクリックアミン類の生成は、フェノール性抗酸化剤中のbutylated hydroxyanisole (BHA), propyl gallate (PG), sesamol, esculetin, epigallocatechin gallate (EGCG) で、用量依存的に効果的に抑制することができた。

【0019】ロ) 魚肉 (例えば、カツオ肉) の加熱乾燥において、上記ヘテロサイクリックアミン類の生成は、イ) に列挙したフェノール性抗酸化剤、緑茶、または緑茶抽出液での前処理により、効果的に抑制することができた。

【0020】ハ) 電子スピン共鳴 (ESR) 法による測定の結果、モデル系を加熱すると、不安定なpyradineカチオンラジカルが発生するが、このラジカルの発生は、上記のフェノール性抗酸化剤の使用により、抑制することができた。

【0021】ニ) 5, 5-dimethyl-1-pyrroline (DMPO) とN-tert-butyl- $\alpha$ -phenylnitron (PBN) を用いたESRスピントラッピング法による測定の結果においても、モデル系を加熱すると、炭素が中心にある不安定なラジカルが生成するが、このラジカルの発生は、上記のフェノール性抗酸化剤の使用により、抑制することができた。

【0022】なお、この不安定なフリーラジカルMaillard反応中間体は、imidazoquinoline型ヘテロサイクリックアミン類の生成に重要な役割を果たし、フェノール性抗酸化剤は、効果的にラジカル種を捕捉し、変異原生成を抑制するものと思われる。

【0023】以上から、ヘテロサイクリックアミン類の生成に対するフェノール性抗酸化剤の阻害作用における反応機構は、中間に生成するフリーラジカルを消去することによることが明らかである。

【0024】以上の知見に基づき、本発明の魚肉または畜肉の加熱食品におけるヘテロサイクリックアミン類の生成抑制方法は、魚肉または畜肉の加熱食品を調製するに際し、フェノール性抗酸化剤を使用することを特徴とする。

【0025】また、本発明の節類の製造方法は、フェノール性抗酸化剤、緑茶、または緑茶抽出液の存在下において、魚肉 (例えば、カツオ肉) の煮熟を行うことを特徴とする。

【0026】そして、上記のフェノール性抗酸化剤は、BHA, PG, sesamol, esculetin, EGCGであることが好ましい。

【0027】なお、これらのフェノール性抗酸化剤において、BHAとPGは、食品添加物として認められている合成抗酸化剤であり、Sesamolは、ゴマ油から発見された抗酸化剤であり、Esculetinは、セイヨウトチノキの葉から見出されたesculinのアグリコンであり、EGCGは、緑茶の主要ポリフェノールである。

【0028】本発明において、フェノール性抗酸化剤、緑茶、または、緑茶抽出液の使用量は、フェノール性抗酸化剤として、10mM~1M程度が好ましく、特に、100mM程度が適している。

【0029】

【発明の実施の態様】以下、実験例により、本発明を、具体的に説明する。

【0030】〔1〕フェノール性抗酸化剤存在下でのグルコース/グリシン混合モデル系およびグルコース/グリシン/クレアチニン混合モデル系の加熱：グルコース/グリシンの固体混合モデル系と、グルコース/グリシン/クレアチニンの固体混合モデル系とを、次の要領で、変異原性試験とESRスピントラッピング試験用に加熱した。

【0031】すなわち、各フェノール性抗酸化剤の添加または無添加の上記両固体モデル系を、そのまま、あるいは氷またはジエチレングリコール：水 (8：2《v/v》) 中に入れ、これらを密封試験管中において、一定時間、一定温度で加熱した。

【0032】〔2〕フェノール性抗酸化剤または緑茶抽出液存在下での魚肉 (サバ、ムロアジ、イワシ、マグロ節等) 例えば、カツオ肉の加熱乾燥：20gの生カツオ肉二切れづつを、水、0.5%EGCG溶液、または50gの加熱乾燥した緑茶葉を1000mlの沸騰水に5分間入れ濾紙でろ過して調製した5%緑茶抽出液中に、それぞれ浸した。

【0033】それぞれ40分間沸騰させて得た蒸煮カツオ肉二切れづつを、上面に小孔のあるステンレス製の円筒箱 (直径140mm, 高さ140mm) に置いた。

【0034】円筒箱をホットプレート上に直接置いて、蒸煮カツオ肉を、一定時間、一定温度で加熱し乾燥した。

【0035】〔3〕変異原性試験：変異原性は、矢作らが考案したSalmonella typhimurium TA98系とS9mixを用いるpreincubation法に従って試験した。

【0036】なお、S9mix (フェノバルビタールと5, 6-ベンゾフラボンで処理したラット肝ミクロソームから調製したmicrosomal S9 system) は、和光純薬から入手したものを使用した。

【0037】上記〔1〕〔2〕で調整した試料をDMSOに溶解した溶液0.1mlと水に溶解した水溶液0.1mlを、それぞれプレートに入れた。

【0038】試験には、二連のプレートを用いた。

【0039】His<sup>+</sup> revertantコロニー数は、プレート当たりの自発的に形成されるHis<sup>+</sup> revertantコロニー数を差し引いて求めた。

【0040】バックグラウンドのHis<sup>+</sup> revertantコロニー数 (自発的に形成されるコロニーの数) は、24~28であった。

【0041】モデル系についての変異原性試験は、上記の〔1〕で得た加熱粉末0.56gを、20mlの水またはジエチレングリコール水溶液に溶解したものを使用した。

【0042】なお、ジエチレングリコール水溶液に溶解したものは、これをさらにDMSOで10倍に希釈したものか、あるいは次の要領によりblue rayon法で精製したものを使用した。

【0043】すなわち、ジエチレングリコール水溶液に溶解したものを5mlを100mlの水で希釈し、この水溶液に0.1gのblue rayon (銅フタロシアニンスルホン酸を吸着させたレイオン、フナコシ薬品 (株) 製) を加え、1時間激しく攪拌してからblue rayonを回収した。

【0044】次に、別のきれいなblue rayonを加え、同様に処理した。

【0045】集めたblue rayonをまとめ、100mlのメタノール濃アンモニア水 (1000:1《v/v》) で二度抽出し、抽出液を50~60℃で乾固し、残渣を2.0mlのDMSOに溶解して変異原性試験に用いた。

【0046】カツオ肉の変異原性試験では、上記の〔2〕で得た加熱乾燥肉中の変異原を、次の要領によりblue rayon法で精製したものを使用した。

【0047】すなわち、5gの加熱乾燥肉を砕いて粉にし、300mlの沸騰水で5分間抽出した。抽出液中の変異原をblue rayon (0.1g×2) に吸着させ、メタノール濃アンモニア水で溶出して精製した。

【0048】溶出液を乾固させ、0.1mlのDMSOに溶解して変異原性試験に供した。

【0049】〔4〕ESR法による測定: ESR法による直接測定およびスピントラッピングを伴う測定は共に、日本電子のX-band JES-RE1X spectrometerを用い、室温で、Mn<sup>2+</sup>をマーカーとし、平坦な石英セルで、次の条件にて行った。

【0050】測定条件: field setting: 335.5mT

scan range: 10mT

modulation frequency: 100kHz

照射強度: 10mW

modulation amplitude: 0.1mT

〔5〕結果:

1) フェノール性抗酸化剤によるグルコース/グリシン/クレアチニン加熱混合物でのimidazoquinoline型変異原生成の抑制; 図1に示すimidazoquinoline型ヘテロサイクリックアミン類、すなわち、2-amino-3, 8-dimethylimidazo (4, 5-f) quinoxaline (MeIQx), 2-amino-3, 7, 8-trimethylimidazo (4, 5-f) quinoxaline (7, 8-DiMeIQx), 2-amino-3, 4, 8-trimethylimidazo (4, 5-f) quinoxaline (4, 8-DiMeIQx), 2-amino-3-methylimidazo (4, 5-f) quinoxaline (IQx) は、グルコース/グリシン/クレアチニンを、水中で、またはジエチレングリコール水溶液中で、加熱することにより生成し、代謝を活性化したSalmonella typhimurium TA98系統に対し変異原として作用する。

【0051】これに対し、上記〔1〕、〔3〕および〔4〕の要領で、図2に示すBHA, PG, sesamol, esculetin, EGCGのフェノール性抗酸化剤のimidazoquinoline型ヘテロサイクリックアミン類の生成に対する効果を調べた。

【0052】具体的には、グルコース (1mmol) /クレアチニン (2mmol) モデル系そのもの、あるいは該モデル系にBHA (1mmol) またはEGCG (1mmol) を添加したものを水に入れ、200℃で30分間加熱し、代謝活性化したS. typhimurium TA98系統を用いて、変異原試験を行った。

【0053】BHAまたはEGCG添加系は、無添加系に比べ、His<sup>+</sup> revertant数を、それぞれ30%、50%にまで減少させた。

【0054】また、グルコース (0.2M) /グリシン (0.4M) /クレアチニン (0.4M) モデル系そのもの、あるいは該モデル系に各フェノール性抗酸化剤を100mMの濃度で添加したものを、ジエチレングリコール水 (8:2《v/v》) に入れ、120℃で2時間加熱し、代謝活性化したS. typhimurium TA98系統を用いて、変異原試験を行った。

【0055】この結果を図3に示す。

【0056】図3中、AはBHA、BはPG、Cはse

samol, Dはesculetin、EはEGCGを添加した結果を示しており、各図の横軸がこれらフェノール性抗酸化剤の添加濃度、縦軸がHis<sup>+</sup> revertant数の減少率(%)である。

【0057】図3から明らかなように、各フェノール性抗酸化剤は、用量依存的に、変異原の生成を抑制しており、具体的には、各フェノール性抗酸化剤は、100mMの濃度で、変異原性を50%以下に抑制し得ることが判る。

【0058】また、BHA(図3のA)とEGCG(図3のE)が最も強力で、100mMの濃度で、変異原性を20~40%に減少させることができる。

【0059】なお、フェノール性抗酸化剤無添加のものについて、DMSOで希釈した溶液0.1ml当たりのHis<sup>+</sup> revertantコロニー数は490であった。

【0060】ただし、上述の実験では、各フェノール性抗酸化剤が、変異原の生成を抑制したのか、あるいは変異原性試験を妨害したのかは明らかでない。

【0061】そこで、モデル系で生成した変異原を、変異原試験の前に、上記の〔3〕のようにして精製した。

【0062】具体的には、グルコース(0.02M)/グリシン(0.04M)/クレアチニン(0.04M)モデル系をジエチレングリコール水(8:2《v/v》)に入れたものか、これにBHAまたはEGCGを添加したものを、120℃で2時間加熱した際に生成した変異原を、変異原試験に供する前に、上記〔3〕のblue rayon法で精製した。

【0063】このようにして精製した変異原について、代謝活性化したS. typhimurium TA98系統を用いて、変異原試験を行った。

【0064】この結果を図4に示す。

【0065】図4中、AはBHA、BはEGCGを添加した結果を示しており、各図の横軸がこれらフェノール性抗酸化剤の添加濃度、縦軸がHis<sup>+</sup> revertantの減少率(%)である。

【0066】図4から明らかなように、これらのフェノール性抗酸化剤は、効果的に変異原生成を抑制することが判る。具体的には、BHAは、20mMと100mM

で、変異原性をそれぞれ60%と20%に減少させ、EGCGは、同一の濃度で、変異原性をそれぞれ40%と2%に減少させることが判る。

【0067】なお、フェノール性抗酸化剤無添加のものについて、DMSOで希釈した溶液0.1ml当たりのHis<sup>+</sup> revertantコロニー数は250であった。

【0068】これから、モデル系での総imidazoquinoline型ヘテロサイクリックアミン変異原の生成は、フェノール性抗酸化剤の添加により、抑制されることが明確である。

【0069】2)加熱乾燥カツオ肉でのimidazoquinoxaline型変異原の生成抑制; Imidazoquinoxaline型変異原であるMeIQxや4,8-DiMeIQxが、煙煙乾燥したカツオ肉(節類、例えば、鰹節)中で生成する。

【0070】これらの変異原は、カツオ肉の乾燥中に生成し、煙蒸中は生成しない。

【0071】これに対し、上記〔2〕、〔3〕および〔4〕の要領で、EGCGおよび該EGCGを多量に含む緑茶抽出液の、加熱乾燥中のカツオ肉での変異原生成に関する抑制効果を調べた。

【0072】具体的には、0.5%のEGCG溶液または5%の緑茶抽出液中で、20gの生のカツオ肉片二切れを40分間煮沸し、これらの抗酸化物質をカツオ肉に浸透させた。

【0073】蒸煮したカツオ肉を、100~110℃または110~120℃で、24時間または48時間加熱乾燥した。

【0074】その際、ほとんどの水分が蒸発し、重量の70%が消失した。

【0075】乾燥後に、上記〔3〕のblue rayon法で精製した。

【0076】このようにして精製した加熱乾燥カツオ肉について、代謝活性化したS. typhimurium TA98系統を用いて、変異原試験を行った。

【0077】この結果を表1に示す。

【0078】

〔表1〕

	温度	加熱乾燥 時間 (h)	Hist+ revertant 重量 (g)	減少率 (%)
水	a	24	118	100
0.5%EGCG	a	24	55	47
水	a	48	416	100
0.5%EGCG	a	48	122	29
水	b	24	1582	100
5%緑茶抽出液	b	24	450	28
水	b	48	1201	100
5%緑茶抽出液	b	48	367	31

注) a: 100~110℃  
b: 110~120℃

【0079】表1から明らかなように、Hist+ revertantコロニー数は、EGCGまたは緑茶抽出液の添加により、劇的に減少することが判る。

【0080】EGCGまたは緑茶抽出液の添加により変異原は、それぞれ50%以下または30%以下になる。

【0081】3) 加熱したモデル系でのESR: グルコース (0.2M) / グリシン (0.4M) / クレアチニン (0.4M) モデル系を、ジエチレングリコール水 (8:2《v/v》) 中に入れ、120℃で2時間加熱している際に、ESRスペクトルを測定すると、超微細構造 (hyperfine structure) を持たない幅広のシグナルが20~120分間の加熱で現れた (データは図示しない)。

【0082】これは、糖/アミノ酸の褐色 Maillard 反応物中に検出される安定なフリーラジカルによるもので、メラノイジンラジカルと呼ばれているものと同一のものであった。

【0083】そこで、モデル系での不安定なフリーラジカルを探すために、上記系からクレアチニンを除き、上記と同一条件で加熱している際に、ESRスペクトルを測定した。

【0084】この結果を図5に示す。

【0085】図5から明らかなように、5分間の加熱で特徴的な多重線 ESR 信号が現れ、次の5分間の加熱で消失し、20分間の加熱後に安定な幅広の信号が現れた。

【0086】並木らは、pHが高いと、糖/アミノ酸水溶液の Maillard 反応で、pyrazine カチオンラジカルが生成することを報告している。

【0087】本発明で見出された不安定なフリーラジカル (図6A) は、以前報告されている2つの pyrazine 窒素 (0.81mT)、4つの等価な pyrazine 水素 (0.30mT)、4つの側鎖の水素 (0.49mT) の hyperfine splitting constants (hfsc) に基づく、コンピュータシミュレーション (図6B) との比較から、1,4-di(carboxymethyl) pyrazine カチオンラジカルと同定される。

【0088】クレアチニンを加えたグルコース (0.2M) / グリシン (0.4M) / クレアチニン (0.4M) モデル系で、pyrazine カチオンラジカルによる ESR 信号が出なかった理由は、不安定な該カチオンラジカルが、クレアチニンと縮合して imidazo quinoxaline 型のヘテロサイクリックアミン変異原を構築したためと考えられる。

【0089】一方、グルコース (0.2M) / グリシン (0.4M) モデル系を、水100%の中に入れ、120℃で2時間加熱すると、加熱中ずっと pyrazine カチオンラジカルによる ESR 信号は観察されなかった (データは図示しない)。

【0090】このことは、グルコース/グリシンモデル系で、含水量が多いと、該ラジカルの生成が抑制されるか、あるいは該ラジカルが破壊されることを示している。

【0091】また、水100%中で、このグルコース/グリシンにクレアチニンを加えたモデル系を加熱すると、ジエチレングリコール水中での加熱の際より、ずっと少量の変異原しか生成されなかった。

【0092】以上のように、反応液 (加熱液) 中に、高濃度の水が存在すると、pyrazine カチオンラジカルと変異原の生成が共に効果的に抑制されることから、pyrazine カチオンラジカルの生成が、変異原の生成におけるキー・ステップ (key step) と推測される。

【0093】そこで、pyrazine カチオンラジカルの生成に対するフェノール性抗酸化剤の効果、グルコース/グリシンモデル系をジエチレングリコール水中に入れ、これに0.1MのBHA、sesamol、EGCGを、それぞれ添加し、加熱して調べた。

【0094】この結果を図7に示す。

【0095】図7から明らかなように、Pyrazine カチオンラジカルによる ESR 信号の強度は、これらフェノール性抗酸化剤の存在により減少することが判る。

【0096】すなわち、これらの抗酸化剤は、Pyrazine カチオンラジカルの生成を阻害するか、あるいは



は該カチオンラジカルを破壊するものと推測される。

【0097】対照的に、melanoidinラジカルの生成は、これらの抗酸化剤によっては抑制されていない。

【0098】4) 加熱したモデル系でのESRスピントラッピング: DMPOやPBNを用いるESRスピントラッピング法を、pyrazineカチオンラジカル以外の不安定フリーラジカル種の検出に用いた。

【0099】グルコース(1mmol)/グリシン(2mmol)/クレアチニン(2mmol)モデル系をそのまま(粉末混合物のまま)で、200℃で3分間オーブンで加熱し、DMPO溶液に加えると、図8Aに示すように、hfsc値が、 $aN=1.58\text{mT}$ 、 $aH=2.26\text{mT}$ のトリプレット(3重線)から成るダブレット(2重線)として、6本の信号が現れ、これらのhfsc値は、炭素が中心にあるラジカルへのDMPOのスピ付加物に特徴的なものである。

【0100】また、上記の加熱したモデル系を、PBN溶液に加えると、図8Bに示すように、同様のシグナル( $aN=1.57\text{mT}$ 、 $aH=0.37\text{mT}$ )が現れ、これらのhfsc値は、炭素が中心にあるラジカルへのPBNのスピ付加物に特徴的なものである。

【0101】グルコース(0.2M)/グリシン(0.4M)/クレアチニン(0.4M)モデル系を、ジエチレングリコール水(8:2《v/v》)の中に入れ、120℃で120分間加熱し、DMPO溶液またはPBN溶液に加えると、5分間の加熱で、炭素が中心にあるラジカルへのスピ付加物を示す6本の信号が観察された(データは図示しない)。

【0102】上記のモデル系からクレアチニン(0.4M)を除いたモデル系では、図9に示すように、DMPO(図9A)やPBN(図9B)とのスピ付加物が5分間の加熱で現れ、さらに加熱すると信号は徐々に消失し、melanoidinラジカルが30分間の加熱で生成した。

【0103】対照的に、クレアチニンを含まないモデル系を、水100%の中に入れ、120℃で120分間加熱しても、スピ付加物の信号は検出されなかった(データは図示しない)。

【0104】このこともまた、反応液(加熱液)中に高濃度に水が存在すると、炭素が中心にあるラジカルと変異原の生成のどちらもが効果的に抑制されることを示しており、炭素が中心にあるラジカルの生成が変異原の生成に関与していることが推測される。

【0105】また、フェノール性抗酸化剤(0.1M)とクレアチニン(0.4M)が、DMPOまたはPBNとのスピ付加物の生成に及ぼす影響を、グルコース(0.2M)/グリシン(0.4M)モデル系を、ジエチレングリコール水(8:2《v/v》)の中に入れ、加熱して検討した。

【0106】この結果を図10に示す。なお、図10AがDMPOとのスピ付加物、図10BがPBNとのスピ付加物の生成に及ぼす影響を示している。

【0107】図10から明らかなように、スピ付加物の信号強度は、BHA、sesamol、EGCG(それぞれ0.1M)により弱くなることが判る。

【0108】また、クレアチニン(0.4M)は、スピ付加物の生成には影響を及ぼさず、このことから、炭素が中心にあるラジカルがクレアチニンの存在下で生成していることが判る。さらに、クレアチニン存在下でのスピ付加物の信号強度は、BHA、sesamol、EGCG(それぞれ0.1M)により効果的に弱くなることが判る。

#### 【0109】〔6〕考察

(1) 種々のフェノール性抗酸化剤が、グルコース/グリシンまたはグルコース/グリシン/クレアチニンからなるモデル系の加熱と、カツオ肉の加熱乾燥とにおいて、imidazoquinoxaline型のヘテロサイクリックアミン類の生成を、効果的に抑制することができる。

【0110】これは、フライ操作の前に、牛肉にクロロゲン酸やBHAを添加すると、加熱操作中の変異原の生成が抑制されるというWeosburgerらの結果と一致するものである。(2) 変異原の生成は、上記モデル系あるいはカツオ肉を加熱する際の、不安定なフリーラジカルMaillard反応中間体、pyrazineカチオンラジカル、炭素が中心にあるラジカルの精製によるものと推測される。

【0111】フェノール性抗酸化剤で、pyrazineラジカルと、炭素を中心に持つラジカルを減らすと、変異原の生成は抑制される。

【0112】(3) imidazoquinoxaline型ヘテロサイクリックアミン類の生成に対し、3つの重要な示唆を与えることができる。

【0113】i) 一つは、これら変異原の生成機構に関与する。

【0114】前述のように、グルコース/グリシンのMaillard反応によるimidazoquinoxaline型ヘテロサイクリックアミン類の生成に際して、クレアチニンが重要な役割を果たしていることを報告しているが、反応の詳細な機構は不明である。最も可能性のある機構として、グルコース/グリシン/クレアチニンのMaillard反応で生成するdihydropyrazineとアルデヒドの縮合であることが提唱されている。

【0115】また、前述したように、この機構とは逆に、変異原の生成には、pyrazineカチオンラジカルを含むフリーラジカル機構が関与していることも、Peasonらにより提唱されているが、この仮説を支持するデータは、今日までほとんど出て来ない。

【0116】これらに対し、以上の結果では、不安定なフリーラジカルMaillard中間体、pyrazineカチオンラジカル、炭素が中心にあるラジカルが、変異原の生成に関与する証拠を与えている。

【0117】種々のフェノール性抗酸化剤が、変異原の生成を抑え、同様に変異原生成反応で、pyrazineカチオンラジカルと、炭素を中心に持つラジカルとを抑制するか、あるいは破壊するかするため、これらのラジカル種が変異原の生成に関して鍵となる中間体(key intermediate)と推測される。

【0118】炭素を中心に持つラジカルの構造は明らかではなく、それらはpyrazineカチオンラジカルから発生した二次フリーラジカルなのか、それともMaillard反応から全く異なった機構で独立に生成するのかは知られていない。

【0119】ただし、pyrazineカチオンラジカルと同様に、炭素を中心に持つラジカルは、変異原の生成に重要な役割を果たしていると推測される。

【0120】ii) 二つは、魚肉や畜肉の加熱を伴う調理・加工時のimidazoquinoxaline型ヘテロサイクリックアミン類の生成を抑制するのにフェノール性抗酸化剤が有効であるということである。

【0121】ここで用いたフェノール性抗酸化剤は、全て、グルコース/グリシンまたはグルコース/グリシン/クレアチニンモデル系の加熱とカツオ肉の加熱乾燥において、imidazoquinoxaline型ヘテロサイクリックアミン類の生成を抑制した。

【0122】上記のモデル系において変異原の生成を効果的に抑えるには、かなり高濃度のフェノール性抗酸化剤を必要とするが、日本人は、平均して、一日当たり1gの鰹節を食べ、これは、2ngのMeIQxに相当するため、カツオ肉の鰹節への加工に際し、変異原の生成を抑制することは重要である。

【0123】カツオ肉の加熱乾燥時の変異原の生成は、フェノール性抗酸化剤のみならず、緑茶抽出液(フェノール性抗酸化剤であるEGCGを含む)により、効果的に抑制することができる。

【0124】iii) 三つは、不安定なフリーラジカルMaillard中間体の生成を、他の手段で抑制すると、魚肉や畜肉の調理・加工中のヘテロサイクリックアミン類の生成を、抑制することができるということである。

【0125】前述したように、過剰のグルコースやインドール誘導体を牛肉やモデル系に添加すると、非ラジカル成分であるクレアチニンやアルデヒドのマスクングと推測される作用により、変異原の生成を抑制すること、また含水量が高いと、変異原の生成が低くなることが報告されている。

【0126】以上の結果では、空気中で生のカツオ肉を100~110℃で50時間加熱すると、水分の減少で

重量の70%が失われ、代謝活性化したS. typhimurium TA98で測定したカツオ肉のg当たりのHis<sup>+</sup> revertantコロニー数は、885に増加した。

【0127】これとは対照的に、蒸気中でカツオ肉を同一時間、同一温度で加熱すると、重量の減少はわずか8.7%で、g当たりのHis<sup>+</sup> revertantコロニー数は、83にまで激減していた。

【0128】これらは、水がimidazoquinoxaline型ヘテロサイクリックアミンの生成を抑制することを明確に示している。

【0129】ただし、水が有効である理由は、これまで知られていなかった。

【0130】本発明者らの上記の実験では、グリコース/グリシンモデル系で、水分含量が高いと、pyrazineカチオンラジカルと炭素を中心に持つラジカルの生成が抑制されている。

【0131】よって、水は、フリーラジカル機構を通じて、変異原の生成を抑制するのに有効であると推測される。

【0132】

【発明の効果】本発明によれば、安全な植物からの抽出成分等であるフェノール性抗酸化剤の使用により、魚肉や畜肉を食材とする調理・加工食品において生成する発癌性を有するとされるヘテロサイクリックアミン類を、効果的に抑制することができる。

【0133】そして、本発明により製造される節類においては、このヘテロサイクリックアミンサイクリックアミン類が極く僅かしか含有せず、安全な食品として提供できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】グルコース/グリシン/クレアチニンモデル系の加熱またはカツオ肉の加熱乾燥により生じるimidazoquinoxaline型ヘテロサイクリックアミン類を示す。

【図2】本発明におけるフェノール性抗酸化剤を示す。

【図3】グルコース/グリシン/クレアチニンモデル系の加熱によるヘテロサイクリックアミン類の生成に対するBHA(A)、PG(B)、sesamol(C)、esculetin(D)、EGCG(E)の抑制効果を示す。

【図4】グリコース/グリシン/クレアチニンモデル系の加熱によるヘテロサイクリックアミン類の生成に対するBHA(A)とEGCG(B)の抑制効果を示す。

【図5】グルコース/グリシン/クレアチニンモデル系の加熱中の不安定なフリーラジカルの生成・消失状況を示すESR測定図である。

【図6】本発明で見出された不安定なフリーラジカル(A)と、従来の報告に基づくコンピュータシミュレーション(B)との比較を示す。

【図7】pyrazineカチオンラジカルの生成に対するフェノール性抗酸化剤の効果を示すESR測定図である。

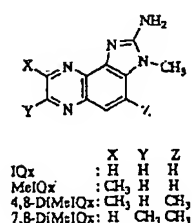
【図8】グルコース/グリシン/クレアチニンモデル系を加熱した際のESRスピントラッピング測定図で、Aが加熱により生成した炭素が中心にあるラジカルへのDMPOのスピン付加物に特徴的なものを示し、Bが当該ラジカルへのPBNのスピン付加物に特徴的なものを示す。

【図9】グルコース/グリシン/モデル系を加熱した際

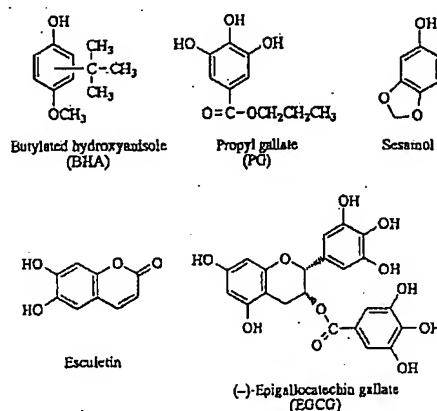
のESRスピントラッピング測定図で、Aが炭素が中心にあるラジカルへのDMPOのスピン付加物に特徴的なものを示し、Bが当該ラジカルへのPBNのスピン付加物に特徴的なものを示す。

【図10】グルコース/グリシンモデル系の加熱に際した際のフェノール性抗酸化剤とクレアチニンがDMPOとのスピン付加物の生成に対する影響を示すESRスピントラッピング測定図で、AがDMPOとのスピン付加物の生成に対する影響を、BがPBNとのスピン付加物の生成に対する影響を示す。

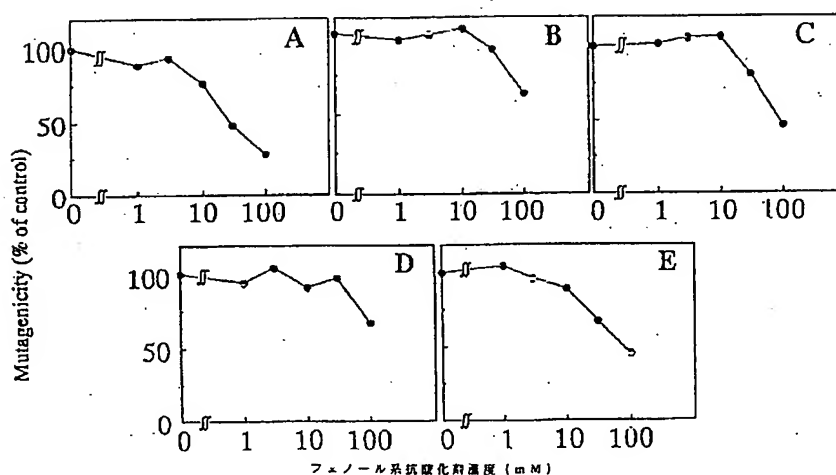
【図1】



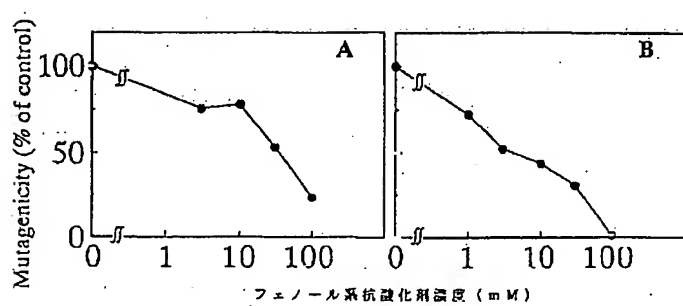
【図2】



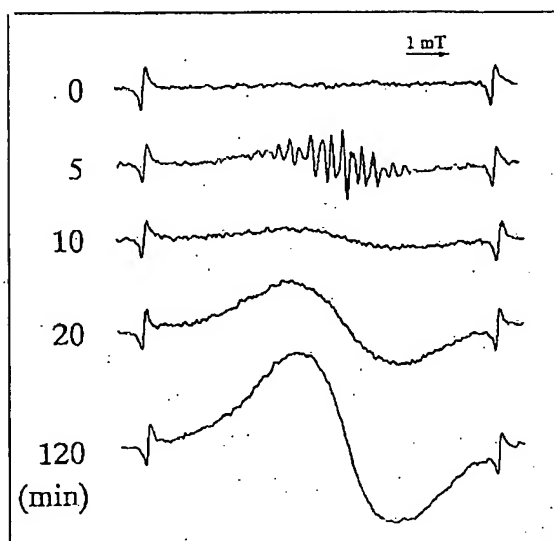
【図3】



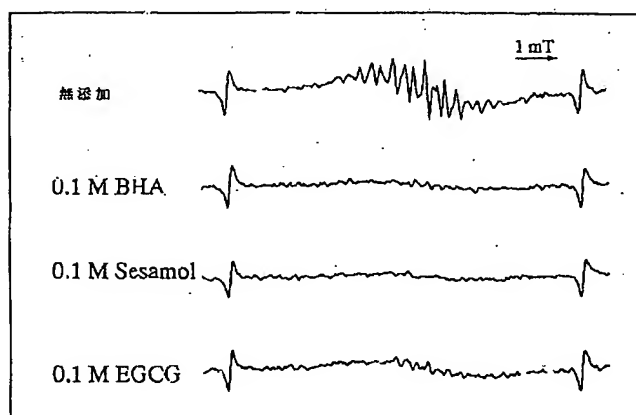
【図4】



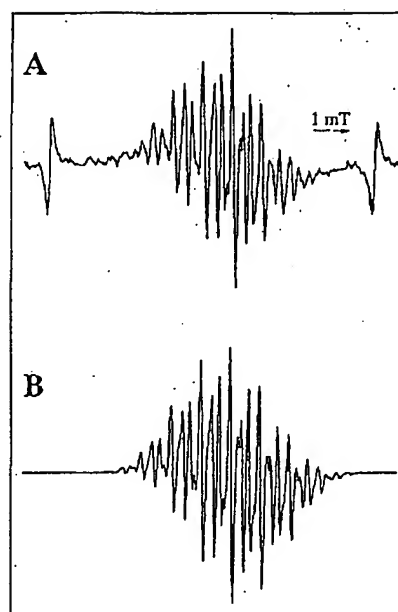
【図5】



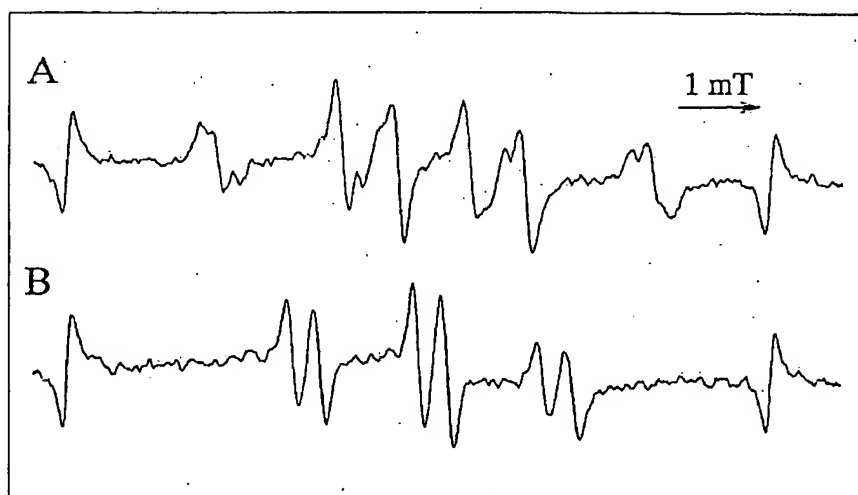
【図7】



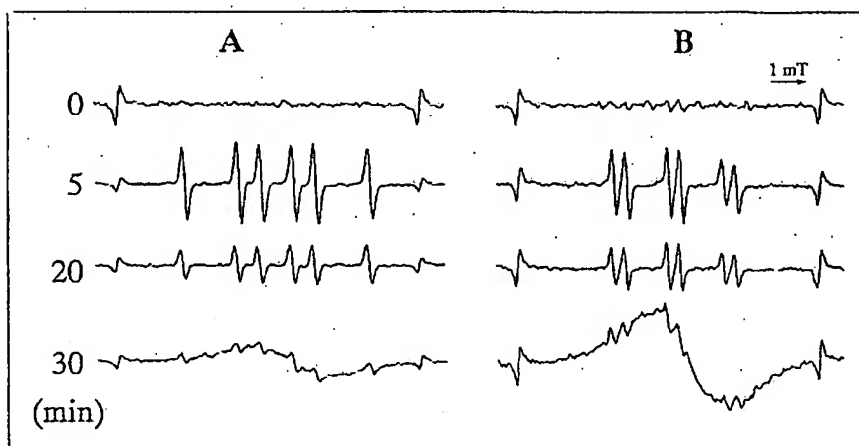
【図6】



【図8】



【図9】



【図10】

